

Atty Dkt. No.
32301WD190

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Brigitte BATHE, et al.

Serial No.: New

Group Art Unit: Unassigned

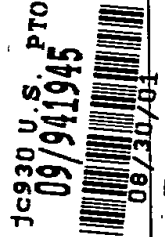
Filed: August 30, 2001

Examiner: Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE sigD GENE

CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY TRANSMITTAL

ATTENTION: BOX MISSING PARTS
Asst. Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231



Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of German Patent Appln. No. 100 43 331.6, filed in Germany on September 2, 2000.

In support of this priority claim, Applicants submit herewith a certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,
SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By:

 45,338

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531
1850 M Street, N.W. (Suite 800)
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 659-2811
Fax: (202) 263-4329

August 30, 2001



1c930 U.S. PTO
09/941945
08/30/01

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 43 331.6

Anmeldetag: 02. September 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das sigD-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC: C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 21. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

Neue für das sigD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigD-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie
10 und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die
20 Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
10 sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigD-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
30 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors D aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
10 genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1
dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
20 kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
25 denen das sigD-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor D kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigD-Gens aufweisen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
- 15 Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor D kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
- 20 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

- 25 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
- 30 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
5 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors D und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und
10 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt
15 aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die
20 insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigD-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder
25 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und
30 gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke,

Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806
- Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
- Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
- Corynebacterium melassecola* ATCC17965
- 15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
- Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
- Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

- 20 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-Faktor D kodierende sigD-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- Zur Isolierung des sigD-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses
- 25 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
 - 30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et

al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
5 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*
10 ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,
25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene,
15 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich
besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und
rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der
Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the
National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649)
20 beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten
langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in
gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren
subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es
z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy
25 of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467,
1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten
Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von
Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von
30 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder
dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical
Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *sigD* kodierende
DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin
wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben
beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des
entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des sigD-Genproduktes
dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch
die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind
ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID
No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der
Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche
wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von
Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner
grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins
führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt,
daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins
dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann
unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of
Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene
77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences
3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die
sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind
ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1
30 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der
Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der
Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich
aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
35 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

5 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit
10 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
15 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x
20 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
25 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
30 Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden,
35 die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigD-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigD-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum*

5 replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). *Journal of Biological Chemistry*

10 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., *Journal of Molecular Biology*, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, *Journal of Bacteriology* 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, *Gene* 41: 337-342) in Frage. Der

15 Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 756-759 (1994))

20 beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (*Bio/Technology* 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (*FEMS Microbiological Letters* 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

25 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem *sigD*-Gen eines oder mehrere

30 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigD-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 10 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 15 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 20 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 25 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-

Dehydratase kodierende Allel *ilvA*(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- 5 • das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 10 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *sigD*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- 20 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigD*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:
- 25 "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

- 5 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 10 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- 15 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

- 20 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

- 25 Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
30 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma

Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) 5 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. 10 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit 15 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen 20 in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar 25 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des sigD-Gens

30 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

- Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- 10 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 15 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit
- 20 T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS
- 25 Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.
- Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-
- 30 Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems
- 35 (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377"

- 5 Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

- Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
- 10 Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1
- 15 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 567 Basenpaaren, welches als sigD-Gen bezeichnet wurde. Das sigD-Gen kodiert für ein Protein von 188 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das sigD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> bbbbbb BT

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1129

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (301)..(864)

<223> sigD-Gen

25

<400> 1

catatgcagg cgaactcctg ctagtacgcc cggtctgacc tgcggttatg tgtcgaggtg 60

aatctccggt gaattcttat agataacttg tttttgcagg tcaggacggg gttaagggga 120

30

tgggtgttat ctgtcagtat gtgaggagat caaggtgttg ggggttctag ttgctaagat 180

ggtgaaaacc cgtgaggcca aaatccaact gggngaatta cccctgcata aatgcatgag 240

35

ggctttatac ttgtcttatt attaaacttt taggggttttg atgcaggaag gtgcgagaac 300

ttg gct gat act gag cgc gag ctc gct gac ctg gta ccg cag gca acg 348

Met Ala Asp Thr Glu Arg Glu Leu Ala Asp Leu Val Pro Gln Ala Thr

1

5

10

15

40

gcg ggc gat cgt cgg gca ttg caa aga ata atg gag att att cac ccc 396

Ala Gly Asp Arg Arg Ala Leu Gln Arg Ile Met Glu Ile Ile His Pro

20

25

30

45

att gtt ttg cgt tat gct cgc gct cgt att gga ggt gga cgc cag cca 444

Ile Val Leu Arg Tyr Ala Arg Ala Arg Ile Gly Gly Gly Arg Gln Pro

35

40

45

50

acg gca gaa gac gtt gct caa gaa atc tgc ctg gcg gta gcc acc tcc 492

Thr Ala Glu Asp Val Ala Gln Glu Ile Cys Leu Ala Val Ala Thr Ser

50

55

60

55

att agg aac ttt gtc gac cag ggt agg ccg ttc atg gcg ttt gtc tac 540

Ile Arg Asn Phe Val Asp Gln Gly Arg Pro Phe Met Ala Phe Val Tyr

65

70

75

80

ggc att gca tct aac aag gtc gca gat gct cac agg gcg atg tcg agg 588

Gly Ile Ala Ser Asn Lys Val Ala Asp Ala His Arg Ala Met Ser Arg

85

90

95

gat aaa tcg act cct att gag gaa gtc cca gaa act tca cca gat act 636
Asp Lys Ser Thr Pro Ile Glu Glu Val Pro Glu Thr Ser Pro Asp Thr
100 105 110

5 ttt acc ccc gaa gac ttt gcg ctg gtc agc gat gga agt aac aga gtt 684
Phe Thr Pro Glu Asp Phe Ala Leu Val Ser Asp Gly Ser Asn Arg Val
115 120 125

10 agg gaa ctt ctc gat cta ctg agt gaa aag gca cgc gac att ctt atc 732
Arg Glu Leu Leu Asp Leu Ser Glu Lys Ala Arg Asp Ile Leu Ile
130 135 140

15 ttg aga gtt atc gtt ggt ctt tcc gca gaa gaa act gca gag atg gtg 780
Leu Arg Val Ile Val Gly Leu Ser Ala Glu Glu Thr Ala Glu Met Val
145 150 155 160

20 ggc agc acc cca ggt gct gta cga gtt gcc caa cac agg gca ctc acg 828
Gly Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Val Ala Gln His Arg Ala Leu Thr
165 170 175

aca ctt cga agc aca ctt gag cag cag gag aac aag taatgactcg 874
Thr Leu Arg Ser Thr Leu Glu Gln Gln Glu Asn Lys
180 185

25 acgtctacat ggtggtgagc aggatggcca ggaacacggt aaaggacagc taaagcagct 934
gttcgacgac gacgcgttct tgactgacct gtcccgcggc gttgatccct cagagggcga 994
30 tgacgccctc gctggcctcc tcctcgattt aacaaaggaa gctcaggagc cgccggcaac 1054
aatgccggat tggctactt tgctccctgg aattttgat caggatcagg atttgccagt 1114
ggaatccact tcgga 1129

35

<210> 2
<211> 188
<212> PRT
40 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
Met Ala Asp Thr Glu Arg Glu Leu Ala Asp Leu Val Pro Gln Ala Thr
1 5 10 15

45 Ala Gly Asp Arg Arg Ala Leu Gln Arg Ile Met Glu Ile Ile His Pro
20 25 30

50 Ile Val Leu Arg Tyr Ala Arg Ala Arg Ile Gly Gly Gly Arg Gln Pro
35 40 45

Thr Ala Glu Asp Val Ala Gln Glu Ile Cys Leu Ala Val Ala Thr Ser
50 55 60

55 Ile Arg Asn Phe Val Asp Gln Gly Arg Pro Phe Met Ala Phe Val Tyr
65 70 75 80

Gly Ile Ala Ser Asn Lys Val Ala Asp Ala His Arg Ala Met Ser Arg
85 90 95

[illegible]

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das sigD-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID
No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-
20 Faktors D aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigD-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das sigD-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sigD-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigD-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man die regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigD kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 30 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,

- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 5 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 10 15.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen mgo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen hom,
- 20 15.11 das für die Theonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),
- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen ilvBN,
- 25 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen ilvD,
- 15.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
5 eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen *pck*,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen *pgi*,
- 10 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
abschwächt.
17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 15 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*
einsetzt.
- 20 19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor D kodieren oder
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *sigD*-Gens
aufweisen,
- 25 dadurch gekennzeichnet,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigD-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.